植 物 分 类 与 资 源 学 报 2014, **36** (4): 505~512
Plant Diversity and Resources DOI: 10.7677/ynzwyj201413181

江西铅山红芽芋胚性愈伤组织的包埋干燥法超低温保存*

洪森荣, 尹明华**, 王艾平
(上饶师范学院生命科学学院, 江西 上饶 334001)

摘要: 对江西铅山红芽芋 (*Colocasia esculenta* var. *cormosus* cv. Hongyayu) 胚性愈伤组织包埋干燥法超低温保存进行了初步的研究。结果表明: 江西铅山红芽芋胚性愈伤组织包埋干燥法超低温保存较佳的条件为: 0.75 mol·L^{-1}蔗糖预培养 3 d; 脱水方式为空气干燥 7 h 或硅胶干燥 11 h; 化冻温度为 37 ℃ (2 min); 冻后培养条件为暗培养 7 d 再转到光周期中培养。此方法超低温保存后的平均成活率约为 45%。超低温保存时间以及是否去除包裹的褐藻酸钙对其成活率无显著性影响。形态学和细胞学检测表明红芽芋胚性愈伤组织冻后再生苗与母本材料相比没有发生变异。

关键词: 江西铅山红芽芋; 胚性愈伤组织; 包埋干燥法; 超低温保存
中图分类号: Q 943.1, S 632.3 **文献标识码**: A **文章编号**: 2095-0845(2014)04-505-08

Cryopreservation of Jiangxi Yanshan Red Bud Taro (*Colocasia esculenta* var. *cormosus* cv. Hongyayu) Embryogenic Calli by Encapsulation-dehydration

HONG Sen-Rong, YIN Ming-Hua**, WANG Ai-Ping
(*College of Life Sciences*, *Shangrao Normal University*, Shangrao 334001, China)

Abstract: Cryopreservation of Jiangxi Yanshan red bud taro (*Colocasia esculenta* var. *cormosus* cv. Hongyayu) embryogenic calli by encapsulation-dehydration was studied. The results showed that the optimal preculture condition of cryopreservation by encapsulation-dehydration was precultured on MS medium supplemented with 0.75 mol·L^{-1} sucrose for 3 days. The optimal dehydration method was dehydration by sterile air in a laminar flow hood for 7 h or sterile dry silica gel for 11 h. the optimal thawing temperature was 37 ℃ (2 min). The optimal culture condition after cryopreservation was first in the dark for 7 d and then transferred to the photoperiod of 14 h·d^{-1}. The average survival rate of embryogenic calli after cryopreservation by encapsulation-dehydration was about 45%. Cryopreservation time and whether the removal of encapsulated calcium alginate had no significant impact on the survival rate. Morphological and cytological study demonstrated that the regenerants were genetically and morphological stable.

Key words: Red bud taro (*Colocasia esculenta* var. *cormosus* cv. Hongyayu); Embryogenic callus; Encapsulation-dehydration; Cryopreservation

芋具有较丰富的营养价值, 在当今蔬菜消费市场中占有重要地位, 是我国南方主要的蔬菜种类。红芽芋 (*Colocasia esculenta* L. Schott var. *cormosus* cv. Hongyayu) 是江西省铅山县传统优势产品, 种植历史悠久。近十余年来, 这一优势产业发展迅速, 已成为铅山县农民增收致富的主

* 基金项目: 江西省科技厅 2012 年农业科技支撑项目基金 (20122BBF60126); 2013 年度江西省高等学校科技落地计划项目 (KJLD13088)
** 通讯作者: Author for correspondence; E-mail: yinminghua04@163.com
收稿日期: 2013-09-10, 2013-11-01 接受发表
作者简介: 洪森荣 (1974-) 男, 硕士, 副教授, 研究方向: 植物组织培养。E-mail: hongsenrong@163.com

导产业，铅山县也成为江西省最大的红芽芋生产基地，2002 年获国家无公害绿色食品证书，2007 年 3 月被中国绿色食品委员会和农业部命名为“红芽芋全国绿色食品标准化生产基地县”，其产品不但热销上海、广东、浙江、湖北、山东等地，而且远销日本、韩国、新加坡等国（郑建平，2010；李火金，2012）。红芽芋中碳水化合物含量较高，脂肪含量较低，蛋白质、维生素及矿物质元素含量丰富，营养价值高，具有良好的食用价值和开发前景（姜绍通等，2012）。目前，传统的江西铅山红芽芋种质资源保存仍采用大田种植的方法，不仅需要大量的人力、物力和财力，而且还不可避免地受到各种自然灾害（如病虫害、干旱、低温等）和人为失误（疏于管理、挂错标签等）的影响，最终可能造成特有种质的遗失或混杂。因此，探索江西铅山红芽芋种质资源超低温保存的方法具有十分重要的意义。

胚性愈伤组织是原生质体操作中最为重要的原始材料，无论是原生质体培养再生植株还是经原生质体融合获得体细胞杂种，都离不开胚性愈伤组织的诱导和保存（曾博雅等，2009）。然而，胚性愈伤组织在长期继代培养过程中经常丢失潜在的形态发生能力，从而增加了遗传学上的不稳定性。因此，胚性愈伤组织的长期保存是人们一直试图解决的问题，超低温保存是胚性愈伤组织长期保存的一种常用方法。植物的胚性愈伤组织如能成功地保存在液氮中，则可为生物工程研究提供全能性原生质体，也可为植物转基因技术提供良好受体材料。

包埋干燥法最早出现在法国学者 Fabre 和 Dereuddre（1990）超低温保存马铃薯茎尖的研究中。包埋干燥法具有样品易于操作、避免了二甲基亚砜和程序降温仪的使用（王君晖等，1999）。目前该技术已应用于长春花（Bachiri 等，1995）、啤酒花（Martinez 等，1999）、葡萄（Wang 等，2000）、苜蓿（Shibli 等，2001）、大叶蝴蝶兰（Amir 等，2011）、冬凌草（Ai 等，2012）、阿拉伯艾蒿（Sarab 等，2012）、苹果（Feng 等，2013）等植物的超低温保存中。目前，国内外尚未见有关包埋干燥法超低温保存红芽芋胚性愈伤组织的报道。本实验建立了红芽芋胚性愈伤组织的包埋干燥法超低温保存体系，为长期稳定保存江西铅山红芽芋种质资源提供技术基础。

1　材料和方法

1.1　材料

江西铅山红芽芋脱毒试管苗，由江西省江天农业科技有限公司提供。

1.2　方法

1.2.1　*胚性愈伤组织诱导*　将江西铅山红芽芋脱毒试管苗的小球茎横切成 1~2 mm 厚，分别接种到诱导培养基上。诱导培养基为 MS+TDZ 2 mg·L^{-1}+2，4-D 1 mg·L^{-1}，并添加 30 g·L^{-1}蔗糖和 7 g·L^{-1}琼脂，pH5.8~6.0。光照条件：黑暗；温度：（25±1）℃。每天观察愈伤组织诱导情况，记录愈伤组织出现的时间、出愈数、愈伤组织颜色和愈伤组织生长情况。60 d 后，选取浅黄色果冻状的胚性愈伤组织继代 2 次，每次 30 d，然后将其应用于包埋干燥法超低温保存实验。

1.2.2　*胚性愈伤组织的包埋干燥法超低温保存程序*　在（25±1）℃下，将约 0.2 g 的红芽芋胚性愈伤组织块转入含 2%褐藻酸钠和 1 mol·L^{-1}蔗糖的 MS 培养基中，然后将包含胚性愈伤组织的混合物滴入含有 0.1 mol·L^{-1} $CaCl_2$和 1 mol·L^{-1}蔗糖的 MS 液体培养基中 30 min，以充分形成直径约 4 mm 的球形包埋珠。每个包埋珠含 1 个胚性愈伤组织块。在无菌条件下，取出包埋珠，放入 100 mL 无菌三角瓶内，倒入 MS+TDZ 2 mg·L^{-1}+NAA 1 mg·L^{-1}（无蔗糖）液体培养基进行洗涤，洗涤后将包埋珠夹出用无菌滤纸片吸干后：（1）将包埋珠转入 MS+TDZ 2 mg·L^{-1}+NAA 1 mg·L^{-1}+ 0~1 mol·L^{-1}蔗糖的液体培养基中，预培养 3 d；（2）或者将包埋珠转入 MS+TDZ 2 mg·L^{-1}+NAA 1 mg·L^{-1}+ 0.75 mol·L^{-1}蔗糖的液体培养基中，预培养 0~7 d。预培养条件均为：光照时间：14 h·d^{-1}；光照强度：12.5~25 μmol·m^{-2} s^{-1}；温度：（25±1）℃。预培养后，包埋珠表面迅速用灭菌滤纸干燥，放置在装有灭菌滤纸的培养皿（直径 9 cm）中，在室温下采用超净工作台的层流空气脱水 0~10 h；或者在含有无菌干燥硅胶的带硅胶塞的 100 mL 密闭三角瓶中脱水 0~15 h。每干燥脱水 1 h 后，均取 15 个包埋珠进行称重：包埋珠放在烘箱中 80 ℃干燥 2 d 后测其含水量，以（小珠鲜重-干重）/鲜重的百分数表示。取脱水包埋珠转移到 2 mL 冻存管中，然后将冻存管迅速置于液氮中保存 1 d。从液氮中取出冷冻管，分别放入温度为 25 ℃、30 ℃、37 ℃或 42 ℃的水浴中化冻 3 min。

1.2.3　*胚性愈伤组织恢复培养及成活率检测*　将化冻后去除或不去除褐藻酸钙的红芽芋胚性愈伤组织块转入分化培养基（MS+TDZ 2 mg·L^{-1}+NAA 1 mg·L^{-1}+30 g·L^{-1}蔗糖+7 g·L^{-1}琼脂）中，然后置于两种培养条件下进行恢复培养。一是将化冻后的红芽芋胚性愈伤组织块直接

置于光周期中培养［光照时间：14 h·d^{-1}；光照强度：12.5~25 μmol·m^{-2} s^{-1}；温度：（25±1）℃）］；另一种是先将化冻后的红芽芋胚性愈伤组织块暗培养 7 d［温度：（25±1）℃］，再转到光周期中培养［光照时间：14 h·d^{-1}；光照强度：12.5~25 μmol·m^{-2} s^{-1}；温度：25±1 ℃）］。60 d 后统计成活率及恢复生长的时间。红芽芋胚性愈伤组织块的成活以其能分化出胚状体为标志。成活率=(超低温保存后胚性愈伤组织分化出胚状体的块数/超低温保存后胚性愈伤组织的总块数)×100%。

1.2.4　*超低温保存后胚性愈伤组织再生苗的形态学和细胞学检测*　将超低温保存后的红芽芋胚性愈伤组织块以及未进行超低温保存处理的红芽芋胚性愈伤组织块（CK，约 0.2 g）同时接入分化培养基（MS+TDZ 2 mg·L^{-1}+NAA 1 mg·L^{-1}+30 g·L^{-1}蔗糖+7 g·L^{-1}琼脂），30 d 后将分化出的胚状体再次转入分化培养基（MS+TDZ 2 mg·L^{-1}+NAA 1 mg·L^{-1}+30 g·L^{-1}蔗糖+7 g·L^{-1}琼脂），60 d 形成完整植株后对以上两种再生苗进行形态学和细胞学检测。形态学检测指标有株高、芽数、根数、根长等。细胞学检测采用染色体数目测定与观察的方法（梁乾隆等，2013）。

1.2.5　*统计方法*　以上实验均重复 3 次（每次实验的样本量均为 45 个），本实验所有数据表示为 Mean ± *SD*，由于统计各处理的细胞活力和成活率时发现多数实验数据不在 30%~70%范围内，为提高显著性检验的精确度，对其进行反正弦转换，然后用 SPSS19.0 软件进行 One-Way ANOVA 分析，再进行 LSD 法检验，$P<0.05$ 为有统计学差异显著性。

2　结果与分析

2.1　预培养对红芽芋胚性愈伤组织包埋干燥法超低温保存的影响

从表 1~2 可知，预培养对红芽芋胚性愈伤组织包埋脱水法超低温保存具有显著影响。当用 0~1 mol·L^{-1}蔗糖对红芽芋胚性愈伤组织预培养 3 d 或用 0.75 mol·L^{-1}蔗糖对红芽芋胚性愈伤组织预培养 0~7 d 时，结果表明，红芽芋胚性愈伤组织包埋干燥法超低温保存的最适宜预培养条件为 0.75 mol·L^{-1}蔗糖预培养 3 d，蔗糖浓度过高过低或预培养时间过长、过短均不利于红芽芋胚性愈伤组织的冻后成活。

2.2　干燥方式和时间对红芽芋胚性愈伤组织包埋干燥法超低温保存的影响

从图 1 和 2 可知，脱水方式对红芽芋胚性愈伤组织包埋干燥法超低温保存无显著影响。无论是层流空气脱水还是干燥硅胶脱水，两者的最高成活率无显著性影响，但其脱水时间对红芽芋胚性愈伤组织包埋干燥法超低温保存还是具有显著影响。结果表明，当层流空气脱水时间超过 4 h 或干燥硅胶脱水时间超过 7 h 时，红芽芋胚性愈伤组织开始出现冻后成活，而且随着脱水时间的延长，冻后成活率均显著增加；当层流空气脱水 7 h 或干燥硅胶脱水 11 h（即含水量为 21.2%~21.5%）时，红芽芋胚性愈伤组织的冻后成活率达到 44.6%~45.2%；之后随着干燥时间的增加，冻后成活率下降。因此，红芽芋胚性愈伤组织包埋干燥法超低温保存的适宜干燥时间为层流空气脱水 7 h 或干燥硅胶脱水 11 h。

2.3　化冻温度对红芽芋胚性愈伤组织包埋干燥法超低温保存的影响

从表 3 可知，化冻温度对红芽芋胚性愈伤组织包埋脱水法超低温保存具有显著影响。用 0.75 mol·L^{-1}蔗糖预培养 3 d 后，在含有干燥硅

表 1　预培养液中蔗糖浓度对红芽芋胚性愈伤组织包埋脱水法超低温保存的影响

Table 1　Effect of sucrose concentration in preculture medium on the cryopreservation of red-buded taro embryogenic callus by encapsulation-dehydration

蔗糖浓度 Sucrose concentration/mol·L^{-1}	成活率 Survival rate/%
0	12.6 ± 6.3 Cd
0.25	25.8 ± 8.2 Bc
0.5	29.4 ± 6.4 Bbc
0.75	46.9 ± 7.5 Aa
1	32.5 ± 3.2 Bb

注：同一列中大、小写字母分别表示在 0.01 和 0.05 水平上的差异性，下同

Note: The capital and small letters in the same volume stand for the signification on 0.01 and 0.05 level, the same as below

表 2　预培养时间对红芽芋胚性愈伤组织包埋脱水法超低温保存的影响

Table 2　Effect of preculture time on the cryopreservation of red-buded taro embryogenic callus by encapsulation-dehydration

预培养时间 Preculture time/d	成活率 Survival rate/%
0	13.8 ± 3.9 Dd
1	35.4 ± 5.2 Cc
3	48.2 ± 4.2 Aa
5	40.9 ± 4.6 Bb
7	34.8 ± 8.2 Cc

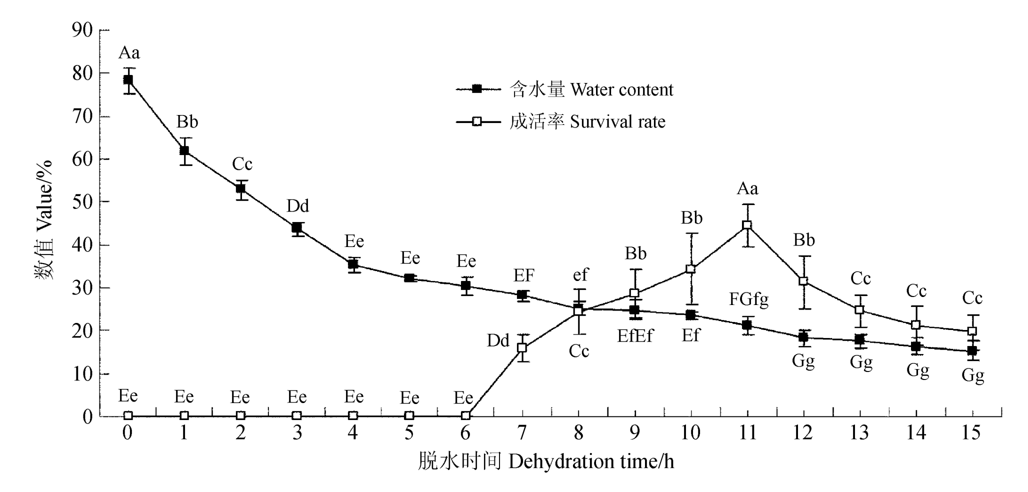


图1 干燥硅胶脱水时间对红芽芋胚性愈伤组织包埋珠含水量的影响大、小写字母分别表示在0.01和0.05水平上的差异性，下同

Fig. 1 Effect of dehydration time on dry silica-gel on the water content of red-buded taro embryogenic callus encapsulated beads The capital and small letters stand for the signification on 0.01 and 0.05 level, the same as below

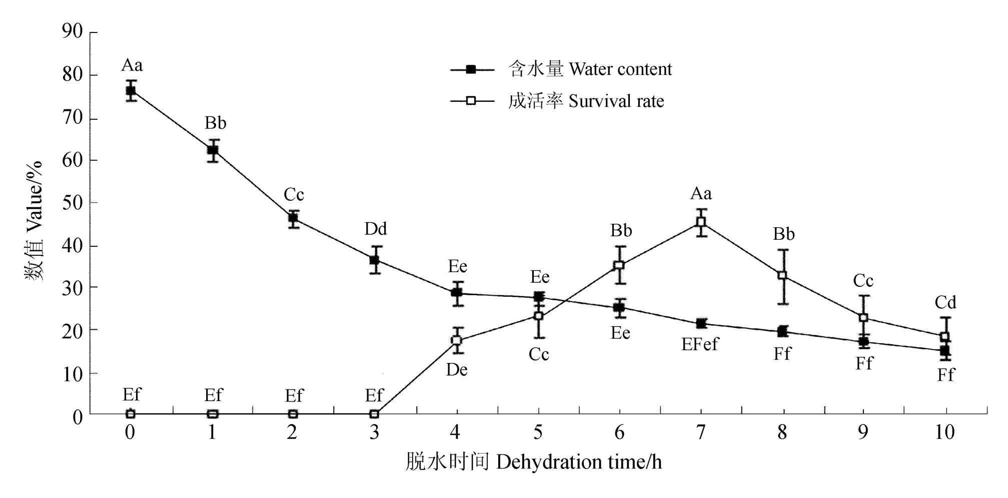


图2 层流空气脱水时间对红芽芋胚性愈伤组织包埋珠含水量的影响

Fig. 2 Effect of dehydration time in laminar airflow on the water content of red-buded taro embryogenic callus encapsulated beads

表3 化冻温度对红芽芋胚性愈伤组织包埋脱水法超低温保存的影响

Table 3 Effect of thawing temperature on the cryopreservation of red-buded taro embryogenic callus by encapsulation-dehydration

化冻温度 Thawing temperature/℃	成活率 Survival rate/%
25	20.4±5.3 Cc
30	32.6±4.2 Bb
37	47.4±6.8 Aa
42	35.2±3.9 Bb

胶的密闭容器中脱水11 h至含水量为21.1%时，投入液氮保存1 d后，将包埋珠取出，用温度为25 ℃、30 ℃、37 ℃或42 ℃的水浴对红芽芋冻后胚性愈伤组织进行化冻时，结果表明，江西铅山红芽芋胚性愈伤组织包埋脱水法超低温保存的适宜化冻温度为37 ℃。

2.4 冻后培养条件对红芽芋胚性愈伤组织包埋干燥法超低温保存的影响

从表4可知，冻后培养条件对红芽芋胚性愈伤组织包埋脱水法超低温保存具有显著影响。包埋珠用0.75 mol·L^{-1}蔗糖预培养3 d后，在含有干燥硅胶的密闭容器中脱水11 h至含水量为21.1%时，投入液氮保存1 d后，将包埋珠取出，用温度为37 ℃的水浴对红芽芋冻后胚性愈伤组织进行化冻，然后直接置于光周期中培养或先暗

培养 7 d 再转到光周期中培养时，结果表明，冻后 7 d 的暗培养有助于提高其冻后成活率。

表 4　冻后培养条件对红芽芋胚性愈伤组织包埋脱水法超低温保存的影响

Table 4　Effect of postthaw culture condition on the cryopreservation of red-buded taro embryogenic callus by encapsulation-dehydration

冻后培养条件 Postthaw culture condition	成活率 Survival rate/%
直接置于光周期下培养 Direct culture in photoperiod	36. 8 ± 5. 4 Bb
先暗培养 7 d 再置于光周期下培养 Firstly culture in dark for 7 d then in photoperiod	45. 9 ± 4. 9 Aa

2. 5　超低温保存时间对红芽芋胚性愈伤组织包埋干燥法超低温保存的影响

从表 5 可知，红芽芋胚性愈伤组织包埋珠用 0. 75 mol · L^{-1}蔗糖预培养 3 d 后，在含有干燥硅胶的密闭容器中脱水 11 h 至含水量为 21. 1%时，投入液氮保存 1 ~ 180 d 后，将包埋珠取出，用温度为 37 ℃的水浴对红芽芋冻后胚性愈伤组织进行化冻，然后先暗培养 7 d 再转到光周期中培养时，其冻后成活率虽有差异，但未达显著性水平。因此，超低温保存时间对红芽芋胚性愈伤组织包埋干燥法超低温保存无显著影响。

2. 6　褐藻酸钙对红芽芋胚性愈伤组织包埋干燥法超低温保存的影响

红芽芋胚性愈伤组织包埋珠用 0. 75 mol · L^{-1}蔗糖预培养 3 d 后，在含有干燥硅胶的密闭容器中脱水 11 h 至含水量为 21. 1%时，投入液氮保存 1 d 后，将包埋珠取出，用温度为 37 ℃的水浴对红芽芋冻后胚性愈伤组织进行化冻，然后将去除或保留褐藻酸钙的包埋珠先暗培养 7 d 再转到光周期中培养。从表 6 可知，培养物抽提即去除包裹的褐藻酸钙对红芽芋胚性愈伤组织包埋脱水法超低温保存的成活率无显著影响，但促进其冻后再生速度。

表 5　超低温保存时间对红芽芋胚性愈伤组织包埋脱水法超低温保存的影响

Table 5　Effect of cryopreservation time on the cryopreservation of red-buded taro embryogenic callus by encapsulation-dehydration

超低温保存时间 Cryopreservation time/d	成活率 Survival rate/%
1	42. 6 ± 6. 3 Aa
30	49. 3 ± 4. 9 Aa
60	45. 8 ± 4. 2 Aa
90	48. 2 ± 7. 2 Aa
120	42. 7 ± 5. 4 Aa
150	51. 4 ± 6. 1 Aa
180	43. 7 ± 8. 2 Aa

2. 7　冻后胚性愈伤组织再生苗的形态学和细胞学检测

从表 7、图 3 ~ 7 可知，红芽芋胚性愈伤组织冻后再生苗与未冻后再生苗在形态指标上的差异均未达显著性水平（$P>0.05$）。而且，红芽芋胚性愈伤组织冻后再生苗与未冻后再生苗的染色体数目经检测未发生变化。以上结果表明，江西铅山红芽芋胚性愈伤组织的包埋干燥法超低温保存可以保证其遗传稳定性。

表 6　褐藻酸钙对红芽芋胚性愈伤组织包埋脱水法超低温保存的影响（42 d）

Table 6　Effect of Ca-alginate on the cryopreservation of red-buded taro embryogenic callus by encapsulation-dehydration

褐藻酸钙 Ca-alginate	成活率 Survival rate/%	平均新生芽长 Average new bud length	平均新生芽数 Average new bud number
去除 Remove	46. 3 ± 2. 9 Aa	1. 3 ± 0. 2 Aa	3. 4 ± 0. 8 Aa
保留 Retain	45. 2 ± 5. 1 Aa	1. 6 ± 0. 4 Bb	1. 8 ± 0. 5 Bb

表 7　超低温保存后红芽芋胚性愈伤组织再生苗的形态学检测

Table 7　Morphological detection of regeneration plantlets of red-buded taro embryogenic callus postthaw

形态指标 Morphological index	正常的胚性愈伤组织再生苗 Embryogenic callus regeneration plantlet without cryopreservation	冻后胚性愈伤组织再生苗 Embryogenic callus postthaw regeneration plantlet
平均株高 Average plantlet height/cm	8. 2 ± 1. 8 Aa	7. 6 ± 2. 3 Aa
平均新生芽数 Average new bud number	4. 2 ± 0. 9 Aa	3. 8 ± 1. 5 Aa
平均新生根数 Average new root number	5. 6 ± 1. 3 Aa	6. 3 ± 2. 2 Aa
平均根长 Average root length/cm	6. 8 ± 2. 1 Aa	7. 9 ± 1. 4 Aa



图3 红芽芋胚性愈伤组织冻后萌发

Fig. 3 Red-budedtaro postthaw embryogenic calli germination



图4 红芽芋胚性愈伤组织冻后再生小苗（左为正常的胚性愈伤组织再生苗，右为冻后胚性愈伤组织再生苗）

Fig. 4 Red-buded taro postthaw embryogenic calli regenerated plantlets (Left was embryogenic callus regeneration plantlet without cryopreservation, right was embryogenic callus postthaw regeneration plantlet)



图5 红芽芋胚性愈伤组织冻后再生小苗增殖（左为正常的胚性愈伤组织再生苗，右为冻后胚性愈伤组织再生苗）

Fig. 5 Red-buded taro postthaw embryogenic calli regenerated plantlet proliferation (Left was embryogenic callus regeneration plantlet without cryopreservation, right was embryogenic callus postthaw regeneration plantlet)



图6 红芽芋胚性愈伤组织冻后再生小苗继代生长（左为正常的胚性愈伤组织再生苗，右为冻后胚性愈伤组织再生苗）

Fig. 6 Red-buded taro postthaw embryogenic calli regenerated plantlet subculture growth (Left was embryogenic callus regeneration plantlet without cryopreservation, right was embryogenic callus postthaw regeneration plantlet)



图7 红芽芋胚性愈伤组织冻后再生植株移栽成活（左为正常的胚性愈伤组织再生苗，右为冻后胚性愈伤组织再生苗）

Fig. 7 Red-buded taro postthaw embryogenic calli regenerated plantlet were transplanted survival (Left was embryogenic callus regeneration plantlet without cryopreservation, right was embryogenic callus postthaw regeneration plantlet)

3 讨论

包埋干燥法是将样品用褐藻酸钙包埋和脱水后，投入液氮中保存的方法。该方法容易掌握，可缓和脱水过程，简化脱水程序，而且一次能处理较多的材料（曾博雅等，2009）。在植物种质资源的超低温保存中，包埋干燥法对物种的依赖性较低，适用范围很广，因此，得到人们的青睐。近年来，包埋干燥法在植物种质保存中应用广泛，且发展迅速，不仅有更多的植物种类和种质类型采用此法保存获得成功，而且在保存技术上也有了新的突破。通常包埋干燥法超低温保存一般包括包埋、预培养、干燥脱水、化冻和再培养等步骤（谷月等，2007）。

预培养一般指用高浓度的蔗糖预培养，预培养有利于保存细胞的生活力，提高材料的抗冻力和抗脱水力，又不至于使材料受到太多的高渗损伤（谷月等，2007）。苹果“Gala”（*Malus×domestica* Borkh.）茎尖在 0.5 mol·L^{-1}蔗糖中预培养 7 d，冻后再生率为 75%（Feng 等，2013）。啤酒花茎尖在 0.75 mol·L^{-1}蔗糖中预培养 2 d，冻后成活率约为 80%（Martinez 等，1999）。大叶蝴蝶兰类原球茎在 0.75 mol·L^{-1}蔗糖中预培养 3 d，冻后成活率和再生率分别为 46.6%和 30%（Amir 等，2011）。苜蓿细胞悬浮培养物在 0.75 mol·L^{-1}蔗糖中预培养 4 d，两种细胞系 5 262 和 5 929 的冻后成活率分别为 22.2%和 8.1%（Shibli 等，2001）。长春花悬浮细胞在 1 mol·L^{-1}蔗糖中预培养 7 d，冻后成活率约为 50%（Bachiri 等，1995）。阿拉伯艾蒿茎尖在 1.0 mol·L^{-1}蔗糖中预培养 3 d 后，经无菌空气流脱水，冻后成活率为 40%（Sarab 等，2012）。本实验也表明，红芽芋胚性愈伤组织在 0.75 mol·L^{-1}蔗糖中预培养 3 d，包埋干燥法超低温保存后的成活率为 46%～49%。因此，在包埋干燥法超低温保存中，预培养液中的最适蔗糖浓度一般为 0.5～1 mol·L^{-1}，预培养时间一般为 2～7 d，具体蔗糖浓度和预培养时间依植物材料而异。

脱水过程就是将保存材料的含水量降低到一个最适范围。包埋珠的含水量是决定细胞成活和再生的一个重要因子（Ai 等，2012）。一般能确保植物材料成活的适宜含水量在 20%～40%（Amir 等，2011）。啤酒花茎尖在干燥硅胶上脱水 4 h，含水量为 16%时，可获得约 80%的成活率（Martinez 等，1999）。冬凌草茎尖在干燥硅胶上脱水 5～7 h，含水量为 21.1%～24.2%时，可获得约 85%的成活率（Ai 等，2012）。枳橙［*Poncirus trifoliata*（L.）Raf. × *Citrus sinensis*（L.）Osbeck.］茎尖在无菌空气流中脱水 8 h，含水量为 17.1%时，可获得约 40%的成活率（Wang 等，2002）。长春花悬浮细胞在无菌空气流中脱水 4 h，含水量为 0.34 g·g^{-1} DW 时，可获得约 50%的成活率（Bachiri 等，1995）。阿拉伯艾蒿茎尖在无菌空气流中脱水 4 h，含水量为 12.56%时，可获得约 6%的再生率（Sarab 等，2012）。苹果“Gala”（*Malus×domestica* Borkh.）茎尖在无菌空气流中脱水 5～7 h，含水量为 20%～22%时，可获得 80%～82%的成活率（Feng 等，2013）。木蓝腋芽分生组织在无菌空气流中脱水 4 h，含水量为 16%时，可获得 56.7%的成活率（Nair 和 Reghunath，2009）。苜蓿细胞悬浮培养物在无菌空气流中脱水 4 h，含水量为 0.33 g·g^{-1} DW 时，两种细胞系 5 262 和 5 929 的冻后成活率分别为 25.1%和 14.3%（Shibli 等，2001）。本实验表明，红芽芋胚性愈伤组织包埋干燥法超低温保存后的成活率依赖于材料脱水后的含水量，与脱水方式无关。只要含水量降至 21.2%～21.3%，红芽芋胚性愈伤组织包埋干燥法超低温保存后的成活率均可达到 45%。Wang 等（2000）在葡萄茎尖的包埋脱水法超低温保存中也发现，葡萄茎尖在无菌空气流中脱水 7 h 含水量为 16.4%或在干燥硅胶上脱水 4.5 h 含水量为 16.1%时，也均可获得 59.3%～60.5%的成活率。这与本实验结果一致。但大叶蝴蝶兰类原球茎在干燥硅胶上的脱水效果好于无菌空气流中脱水，干燥硅胶脱水 6 h 后，含水量为 32%，可获得 30%的再生率（Amir 等，2011）。

化冻方式也会显著影响冻后材料的成活率。研究表明，在 37～40 ℃的水浴中快速化冻约 1～3 min，可以避免慢速化冻过程中再次发生结冰的冷冻伤害（Wang 等，2000）。葡萄茎尖包埋脱水法超低温保存后于 40 ℃水浴快速化冻，其成活率显著高于室温下化冻的效果（Wang 等，2000）。本实验结果也表明，太高或太低的化冻温度均不利于红芽芋胚性愈伤组织包埋干燥法超低温保存

的冻后成活，只有在37 ℃的水浴中化冻3 min，红芽芋胚性愈伤组织的冻后成活率可达47.4%。在进行包埋干燥法超低温保存时，一般不要把包裹的褐藻酸钙去除，可直接将包埋珠进行再培养（Sen-Rong和Ming-Hua，2013）。本实验表明，是否去除包裹的褐藻酸钙对红芽芋胚性愈伤组织包埋干燥法超低温保存的成活率无显著影响，但可促进其冻后芽长和芽数的增加，本实验结果与Wang等（2002）的实验结果一致。

实验结果表明：红芽芋胚性愈伤组织包埋干燥法超低温保存后的平均成活率约为45%，形态学和细胞学检测表明红芽芋胚性愈伤组织冻后再生苗与母本材料相比没有发生变异。

〔参 考 文 献〕

Ai PF, Lu LP, Song JJ, 2012. Cryopreservation of in vitro-grown shoot-tips of *Rabdosia rubescens* by encapsulation-dehydration and evaluation of their genetic stability ［J］. *Plant Cell*, *Tissue and Organ Culture*, **108** (3): 381—387

Amir AK, Uma RS, Paul L *et al*., 2011. Cryopreservation of protocorm-like bodies (PLBs) of *Phalaenopsis bellina* (Rchb. f.) Christenson by encapsulation-dehydration ［J］. *Plant Cell*, *Tissue and Organ Culture*, **107** (3): 471—481

Bachiri Y, Gazeau C, Hansz J *et al*., 1995. Successful cryopreservation of suspension cells by encapsulation-dehydration ［J］. *Plant Cell*, *Tissue and Organ Culture*, **43** (3): 241—248

Fabre J, Dereuddre J, 1990. Encapsulation-dehydration: a new approach to cryopreservation of *Solanum* shoot tips ［J］. *CryoLetters*, **11** (6): 413—426

Feng CH, Cui ZH, Li BQ *et al*., 2013. Duration of sucrose preculture is critical for shoot regrowth of in vitro-grown apple shoot-tips cryopreserved by encapsulation-dehydration ［J］. *Plant Cell*, *Tissue and Organ Culture*, **112** (3): 369—378

Gu Y (谷月), Zhang ED (张恩栋), Wang QH (王起华), 2007. Cryopreservation of plant germplasm by encapsulation-dehydration ［J］. *Plant Physiology Communication* (植物生理学通讯), **43** (6): 1157—1162

Jiang ST (姜绍通), Cheng YZ (程元珍), Zheng J (郑志) *et al*., 2012. Analysis and evaluation of nutritional components of red-buded taro (*Colocasia esulenla* L. Schott) ［J］. *Food Science* (食品科学), **33** (11): 269—272

Liang QL (梁乾隆), Wang CB (王长宝), Ma XG (马祥光) *et al*., 2012. Chromosomal study on Chinese *Bupleurum* L. (Apiaceae) ［J］. *Plant Science Journal* (植物科学学报), **31** (1): 11—22

Li HJ (李火金), 2012. Rapid propagation of Yansan red-buded taro shoot-tip virus-free plantlets and high yield cultivation ［J］. *China Vegetables* (中国蔬菜), (3): 45—46

Martinez D, Tamés RS, Revilla MA, 1999. Cryopreservation of in vitro-grown shoot-tips of hop (*Humulus lupulus* L.) using encapsulation/dehydration ［J］. *Plant Cell Reports*, **19** (1): 59—63

Nair DS, Reghunath BR, 2009. Cryoconservation and regeneration of axillary shoot meristems of *Indigofera tinctoria* (L.) by encapsulation-dehydration technique ［J］. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, **45** (5): 565—573

Sarab AS, Rida AS, Mahmoud AK *et al*., 2012. Cryopreservation of wild Shih (*Artemisia herba-alba* Asso.) shoot-tips by encapsulation-dehydration and encapsulation-vitrification ［J］. *Plant Cell*, *Tissue and Organ Culture*, **108** (3): 437—444

Sen-Rong H, Ming-Hua Y, 2013. A simple cryopreservation protocol for *in vitro*-grown shoot tips of Chinese genuine red bud taro (*Colocasia esculenta* L. Schott var. *cormosus* cv. Hongyayu) by encapsulation-dehydration ［J］. *Scientia Horticulturae*, **162**: 226—233

Shibli RA, Haagenson DM, Cunningham SM *et al*., 2001. Cryopreservation of alfalfa (*Medicago sativa* L.) cells by encapsulation-dehydration ［J］. *Plant Cell Reports*, **20** (5): 445—450

Wang JH (王君晖), Bian HW (边红武), Huang CN (黄纯农), 1999. Advances in research on cryopreservation of plant materials by encapsulation-dehydration method ［J］. *Chinese Bulletin of Botany* (植物学通报), **16** (5): 582—586

Wang QC, Batuman Ö, Li P, *et al*., 2002. Cryopreservation of in vitro-grown shoot tips of 'Troyer' citrange ［*Poncirus trifoliata* (L.) Raf. × *Citrus sinensis* (L.) Osbeck.］ by encapsulation-dehydration ［J］. *Plant Cell Reports*, **20** (10): 901—906

Wang QC, Edna T, Amir A *et al*., 2000. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of grapevine by encapsulation-dehydration ［J］. *Plant Cell*, *Tissue and Organ Culture*, **63** (1): 41—46

Zeng BY (曾博雅), Wang Z (王智), Zhang YF (张云峰) *et al*., 2009. Cryopreservation of rice (*Oryza sativa* L.) embryonic cell suspensions by encapsulation-dehydration ［J］. *Plant Physiology Journal* (植物生理学通讯), **45** (6): 603—606

Zheng JP (郑建平), 2010. High yield cultivation techniques of red-buded taro ［J］. *XianDai Hortiaulure* (现代园艺), (7): 29—30